

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ
NÁPLŇOVÝCH KAPILÁRNÍCH KOLON**

Preparation and Testing of Packed Capillary Columns

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Bc. Martin Franc

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Pavla Coufala, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli, panu Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za odborné vedení a poskytnuté rady. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Adéle Svobodové a Mgr. Marii Honetschlägerové za pomoc s experimentální částí mé práce a Mgr. Anně Hamplové za finanční pomoc z GAUKu 78808 Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze. Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Předmětová hesla

analytická chemie, kapilární kapalinová chromatografie

Klíčová slova

separační impedance, Waltersův test, van Deemterova křivka

Obsah

Seznam zkratek, symbolů a vzorců.....	7
1 Úvod.....	9
1.1 Způsoby plnění.....	10
1.2 Suspenzní plnění.....	10
1.2.1 Kolona.....	11
1.2.2 Frita.....	11
1.2.3 Volba rozpouštědel.....	12
1.2.4 Koncentrace suspenze.....	13
1.2.5 Zásobník suspenze.....	13
1.2.6 Plnění.....	14
1.3 Náplň.....	16
1.3.1 Radiální homogenita náplně.....	16
1.3.2 Axiální homogenita náplně.....	17
1.4 Testování kolon.....	18
1.4.1 Separační impedance.....	19
1.4.2 Waltersův test.....	20
2 Cíl práce.....	22
3 Experimentální část.....	23
3.1 Použité chemikálie.....	23
3.2 Použité přístroje.....	23
3.3 Příprava kolon.....	23
3.4 Plnění kolon.....	24
3.5 Testování kolon.....	26
4 Výsledky a diskuse.....	27
4.1 Vliv sonifikace.....	27
4.1.1 Sonifikace při době usazování 15 minut.....	27
4.1.2 Sonifikace při době usazování 30 minut.....	30
4.2 Vliv doby usazování stacionární fáze.....	32
4.3 Vliv rychlosti plnění.....	34
4.4 Vliv tlaku.....	35

4.5 Částice o průměru 3 μm	38
4.6 Waltersův test.....	39
5 Závěr.....	41
Přehled použité literatury.....	42

Seznam zkratk, symbolů a vzorců

A	příspěvek vířivé difúze (člen van Deemterovy rovnice)
B	příspěvek molekulové difúze (člen van Deemterovy rovnice)
CH_3CN	acetonitril
C_M	příspěvek odporu proti přenosu hmoty v mobilní fázi (člen van Deemterovy rovnice)
C_S	příspěvek odporu proti přenosu hmoty ve stacionární fázi (člen van Deemterovy rovnice)
cm min^{-1}	centimetr za minutu, jednotka lineární rychlosti mobilní fáze
E	separační impedance
H	výškový ekvivalent teoretického patra
H_2O	voda
HI	index hydrofobicity
k	retenční faktor analytu
K	permeabilita
l	litr, jednotka objemu
L	délka kolony
m	metr, jednotka délky
min	minuta, jednotka času
n	počet teoretických pater
p	tlak
p_p	plnicí tlak
Δp	tlakový spád
PEEK	polyetheretherketon
Pa	Pascal, jednotka tlaku
Pa s	Pascal sekunda, jednotka viskozity
SI	index volných silanolových skupin
t_R	retenční čas analytu
u	lineární rychlost mobilní fáze
w_b	šířka píku při základně
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině jeho výšky

f	odpor proti toku mobilní fáze
h	viskozita mobilní fáze
p	index výkonu

1 Úvod

Počátky mikrokapalinové chromatografie spadají do roku 1967, kdy byly použity nerezové kolony s vnitřním průměrem menším než 1 mm k separaci ribonukleotidů [1]. Mikrokapalinová chromatografie se dále vyvíjela a dnes tvoří významnou část kapalinové chromatografie. Její hlavní výhodou je malá spotřeba vzorku i mobilní fáze. Dávkovaný vzorek má obvykle objem pouze několik desítek nanolitů, což umožňuje analyzovat i obtížně získatelné vzorky, například při klinických studiích. Používané průtoky mobilní fáze se pohybují v jednotkách mikrolitrů za minutu. Dochází tak ke snížení nákladů na rozpouštědla a je umožněno použití drahých mobilních fází, jako jsou mobilní fáze s přidavkem chirálního selektoru nebo deuteria. Další výhodou je snadnější napojení chromatografického systému na další analytické metody, například na hmotnostní detektor nebo plamenovou ionizaci. Malé spotřeby chemikálií navíc znamenají snížení zátěže životního prostředí.

V počátcích kapalinové chromatografie byla příprava vlastních kolon nutností. S dalším rozvojem kapalinové chromatografie se začaly objevovat firmy specializující se na výrobu kolon a vlastní příprava přestala být běžná. V dnešní době jsou již komerčně dostupné téměř všechny druhy kolon, čehož využívá naprostá většina laboratoří. Používání vlastních kolon, zejména kapilárních, ale přináší řadu výhod. Nejvýraznější je rozdíl v ceně. Zatímco komerční kolony stojí několik desítek tisíc korun, naplnění kapilární kolony je výrazně levnější. Díky malému vnitřnímu objemu kapiláry, a tedy malému množství potřebné stacionární fáze, dosahují náklady na naplnění jedné kapilární kolony pouze několika set korun. Další výhodou je větší flexibilita. Je možné připravit kolonu se stacionární fází, která je vyžadovaná k řešení daného problému. Ukáže-li se jako nevhodná, je velmi jednoduché a ekonomicky nenáročné připravit kolonu vhodnější. V některých případech je dokonce jediným způsobem, jak získat kolonu s příslušnou stacionární fází, její vlastní příprava. Týká se to například kapilárních kolon pro separace optických izomerů, které se komerčně nevyrábí.

1.1 Způsoby plnění

První kolony byly plněny tzv. za sucha. Stacionární fáze byla jednoduše nasypána do prázdné kolony, poté bylo kolonou poklepáváno, aby došlo k usazení náplně. S vývojem stacionárních fází s menšími částicemi ale tato metoda přestala být účinná a byla nahrazena technikami založenými na principu filtrace. Všechny tyto techniky jsou si velice podobné. Na konec kolony je upevněna frit a před kolonu se umístí zásobník naplněný stacionární fází. Systémem je poté pumpována plnicí fáze. Nejčastěji se jedná o kapalinu [2 – 8], pak se tato metoda označuje jako suspenzní plnění. Dále je možné použít plyn [9] nebo superkritický fluidní oxid uhličitý [10, 11]. Částice stacionární fáze jsou plnicí fází tlačeny a nesený kolonou až k fritě, na které se zachytávají filtrací.

Při přípravě kolon pro preparativní chromatografii se nejčastěji používají kompresní metody [12, 13]. Kolona pro axiální kompresi je vlastně dutý válec s pístem. Válec je naplněn suspenzí stacionární fáze, stlačením pístu pak dojde k usazení náplně. Pro radiální kompresi se používají speciální patrony s pružnými stěnami. Patrona je naplněna stacionární fází a vložena do nerezového válce. Mezi stěnu válce a patronu je pod tlakem pumpována kapalina, čímž dochází ke stlačování patrony a k usazování náplně.

1.2 Suspenzní plnění

V této práci byly kolony připravovány filtrací pomocí kapaliny. Jedná se o nejčastěji používaný způsob plnění. Důvodem je jednoduchost provedení a malé nároky na přístroje. Pro úspěšné naplnění kapilární kolony stačí isokratická pumpa a jako zásobník stacionární fáze prázdná nerezová kolona s vnitřním objemem alespoň 1 cm³. Stacionární fáze je v zásobníku ve formě suspenze, proto se tento způsob plnění označuje jako suspenzní plnění (v anglické literatuře *slurry packing*). Suspenze je do kolony tlačena kapalnou plnicí fází, která je vlastně analogem mobilní fáze v kapalinové chromatografii.

1.2.1 Kolona

Nejdůležitějším požadavkem, který musí kolona splňovat, je hladká vnitřní stěna. Při změnách tlaku v koloně dochází k mírnému pohybu částic stacionární fáze. Částice u stěny kolony se o případné nerovnosti obrušují, čímž dochází k jejich poškozování a následnému snížení separační účinnosti a stability kolony [14]. Dříve používané kolony z nerezové oceli byly vylepšeny pokrytím vnitřní stěny sklem. Tím byl získán hladší a inertnější povrch při zachování strukturní pevnosti [15]. V současnosti jsou v kapilární kapalinové chromatografii nejčastěji používány křemenné kapilární kolony potažené polyimidem. Mají inertní vnitřní stěnu, jsou ohebné a odolné proti mechanickému poškození. Odstraněním krycího polyimidu je umožněna spektrofotometrická nebo fluorescenční detekce přímo na koloně [16, 17]. Je tak odstraněn mrtvý objem mezi kolonou a detektorem. Tím je značně omezeno rozmývání píků a zvyšuje se tak separační účinnost. Zajímavou alternativou jsou kolony PEEKové. Stejně jako křemenné kolony mají hladkou inertní vnitřní stěnu a jsou odolné proti poškození. Jejich výhodou je standardní vnější průměr 1/16", který usnadňuje uzavírání, připojování do chromatografického systému, a dokonce umožňuje zapojení několika kolon za sebe. Nevýhodou je nemožnost spektrometrické detekce přímo na koloně [18].

1.2.2 Frita

Při suspenzním plnění je vždy prvním krokem uzavření výstupního konce kolony fritou. Nejjednodušší způsob používá jako fritu kousek skelné vaty. Frita je vsunuta do kolony a zajištěna vlepením tenčí kapiláry na konec kolony [7, 19]. Tato zakončovací kapilára zároveň spojuje kolonu s detektorem, tím ale přispívá k rozmývání píků. Druhou možností je frita z porézního teflonu. Oproti skelné vatě má menší mrtvý objem a nezvyšuje tolik tlak v koloně. Navíc je možné použít spektrometrickou detekci hned za fritou, čímž dochází k odstranění mrtvého objemu mezi kolonou a detektorem [20]. Nevýhodou je podstatně náročnější postup vlepování frity do kolony. Pro kolony s vnitřním průměrem menším než 50 μm lze vyrobit fritu z oxidu křemičitého. Kapilára

je vsunuta do nádoby s 5 μ m částicemi oxidu křemičitého a částice v ní uvízlé jsou tenkým drátkem posunuty do požadované vzdálenosti od konce kapiláry, kde jsou spečeny dohromady plamenem [21, 22] nebo elektrickým obloukem [23].

1.2.3 Volba rozpouštědel

Podmínky, za kterých je třeba chromatografickou kolonu naplnit, jsou určeny stacionární fází. Vliv nemají pouze vlastnosti jako velikost, tvar a porozita částic. Částice stejného druhu a parametrů od různých výrobců mohou vyžadovat zcela jiné podmínky plnění. Proto bývá plnění kolon označováno za umění a i v dnešní době probíhá nejčastěji metodou pokusů a omylů. Problematika přípravy plnicí fáze a suspenze stacionární fáze byla v minulosti pečlivě studována. Volba vhodných rozpouštědel je prvním problémem. Autoři často před vlastním plněním zkoušeli několik různých kombinací rozpouštědel, aby našli optimální podmínky pro svou stacionární fázi [15]. Systematicky se touto problematikou zabývali především Vissers a kolektiv a Zimina a kolektiv. Zimina a kolektiv [24] studovali změny v průtoku plnicí fáze kolonou během plnění. Nalezli významný vliv složení suspenze. Zkoumali ale rozpouštědla pro plnění běžně nepoužívaná (vodu, kyselinu chlorovodíkovou, ethylenglykol). Vissers a kolektiv [19] testovali účinnost kolon naplněných různými stacionárními fázemi pomocí běžných rozpouštědel, jako je aceton, acetonitril a tetrahydrofuran. Prokázali, že účinnost kolon závisí především na plnicí fázi. Složení suspenze má pouze malý vliv. Podařilo se jim nalézt vztah mezi účinností kolon a rychlostí sedimentace stacionární fáze v použitých rozpouštědlech. Jako plnicí fáze jsou nejvhodnější rozpouštědla, ve kterých částice stacionární fáze tvoří shluky a sedimentují rychle. Naopak v suspenzi je shlukování částic nežádoucí a nejlepších výsledků je dosahováno použitím rozpouštědla, ve kterém částice sedimentují jen minimálně.

1.2.4 Koncentrace suspenze

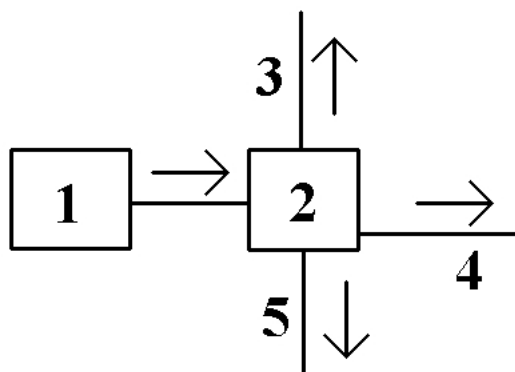
Vliv koncentrace suspenze na účinnost kolon nebyl zkoumán příliš do hloubky. K naplnění kapilární kolony je potřeba jen malé množství stacionární fáze a zásobník suspenze má obvykle objem $0,5 - 2 \text{ cm}^3$. Suspenze tedy může mít velmi malou koncentraci. V praxi se nejčastěji používá koncentrace $0,1 \text{ g cm}^{-3}$. Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací suspenze mírně roste i separační účinnost kolon a výrazně roste rychlost plnění [7]. Závislost separační účinnosti na koncentraci suspenze prokázali také Cortes a Pfeiffer [25], ale pouze u kolon plněných při nižším tlaku (17 MPa). U kolon s malým vnitřním průměrem hrozí riziko vzpříčení částic v koloně a její ucpání. Toto riziko je větší u nepravidelných částic a u částic se širší distribucí velikostí. Při plnění těchto kolon je nutné použít suspenzi o velmi nízké koncentraci, protože do kolony najednou vstupuje jen několik částic a pravděpodobnost jejich vzpříčení je nižší. Pro plnění $5 \text{ }\mu\text{m}$ částic do kolon s vnitřním průměrem $20 \text{ }\mu\text{m}$ byla koncentrace suspenze $0,033 \text{ g cm}^{-3}$ shledána příliš vysokou a musela být snížena až na $0,005 \text{ g cm}^{-3}$ [21]. Dále je vhodné suspenzi před plněním přefiltrovat [22].

1.2.5 Zásobník suspenze

Jako zásobník suspenze se nejčastěji používají trubičky z nerezové oceli [15, 25]. Vhodné jsou například vyprázdňené kolony pro konvenční kapalinovou chromatografii, díky snadnému zapojení do plnicího systému. Aby nedocházelo ke shlukování částic stacionární fáze a k jejich sedimentaci, je suspenze před naplněním do zásobníku sonifikována. Během plnění je pak zásobník často ponořen v ultrazvukové lázni [10, 21], nebo je suspenze magneticky míchána [17]. Pro zlepšení účinnosti sonifikace byl vyvinut zásobník, jehož součástí je ultrazvuková sonda [26]. Takto naplněné kolony měly dobrou separační účinnost. Rozdíl oproti plnění se zásobníkem v ultrazvukové lázni ale zjišťován nebyl.

Existují tři možné způsoby napojení kolony na zásobník (viz obrázek 1). Zřídka používané je horizontální plnění, kdy kolona vede z boku zásobníku. Její vstupní a výstupní konec jsou na stejné úrovni [17]. Při vzestupném plnění vede kolona

ze zásobníku kolmo nahoru. Tento způsob se používal hlavně v dřívějších dobách, kdy převládal názor, že k úspěšnému plnění je nutné zabránit samovolné sedimentaci částic v koloně. Vzestupné plnění tomu napomáhá, protože sedimentující částice odcházejí z kolony zpět do zásobníku [5, 27]. Třetí možností je sestupné plnění, kdy kolona vede ze zásobníku kolmo dolů [28]. Porovnáním vzestupného a sestupného plnění bylo zjištěno, že kolony naplněné sestupně mají o třetinu větší separační účinnost [8].



Obr 1 Napojení kolony na zásobník: (1) pumpa, (2) zásobník suspenze, (3) kolona při vzestupném plnění, (4) kolona při horizontálním plnění, (5) kolona při sestupném plnění. Šipky naznačují směr toku plnicí fáze.

Během vývoje zásobníku vhodného k plnění více kolon najednou byl studován spoj kolony se zásobníkem a jeho vliv na separační účinnost [2]. Bylo zjištěno, že nepravidelnosti mezi kolonou a zásobníkem, jako jsou ohyby a změny průměrů, způsobují vznik asymetrických píků. Nejvhodnější je připojení kolony na zásobník přímo, bez jakéhokoli mezičlánku.

1.2.6 Plnění

V procesu plnění je množství parametrů (např. plnicí tlak a doba plnění) které mnohou mít vliv na separační účinnost kolony. Některé parametry nebyly systematicky studovány vůbec, jiné jen okrajově. Autoři si jejich hodnoty obvykle volí sami odhadem, případně kopírují hodnoty použité ve starších studiích.

Často diskutovaná je volba konstantního tlaku nebo konstantního průtoku plnicí fáze [8]. Který z těchto módů je lepší, nebylo nikdy rozhodnuto a experimentálně

prokázáno. Používanější je plnění při konstantním tlaku. Při konstantním průtoku totiž stejně hraje roli tlakový limit pumpy a plnicího systému. Pro úspěšné naplnění kolony by měl být použit tlak alespoň o 50 % vyšší, než bude tlak provozní [14]. Protože provozní tlak většinou nepřesahuje 10 MPa, lze předpokládat, že plnicí tlak 15–20 MPa je pro plnění dostačující. V praxi se nejčastěji používá tlak kolem 50 MPa [3, 4, 7, 19], ačkoli byly úspěšně naplněny kolony i při nižších tlacích [17]. Za extrémních podmínek byly plněny částice o velikosti 1,5 μm do kolon dlouhých 50 cm. Použitý tlak byl 410 MPa. Tyto kolony dosahovaly při provozním tlaku 140 MPa nízké hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra až 2,1 μm [23].

Naplnění kolony stacionární fází trvá pouze několik minut. Po naplnění kolona není ihned odpojena, ale je dále promývána plnicí fází. Dochází k lepšímu usazení náplně a k její stabilizaci. Při provozu kolony pak na jejím začátku nevzniká mrtvý objem a není rozmývána zóna vzorku. Doba usazování náplně bývá určována prošlým objemem plnicí fáze [8] nebo častěji časem. Obvyklá doba usazování je 20 – 30 minut [10, 21, 29, 30]. Někteří autoři ale volí dobu delší (1 hodina [19], 12 hodin [17]), nebo vyměňují plnicí fází za vodu [15].

Ultrazvukovou lázeň lze mimo přípravy suspenze (viz kapitola 1.2.5) použít i v procesu plnění. Kolona je při plnění a usazování náplně vložena do lázně. Očekává se, že vibrace pomáhají částicím stacionární fáze najít ideální polohu. Náplň je tak stabilnější a separační účinnost kolony větší. Reálný význam sonifikace při plnění je ale otázkou. Někteří autoři používali ultrazvukovou lázeň pouze při plnění [10], jiní sonifikují kolony během plnění i usazování náplně [3, 29]. Ehlert a kolektiv [3] promývali naplněnou kolonu v ultrazvukové lázni při tlaku 50 MPa. Dosáhli usazení a zkrácení náplně téměř o 2 cm. Nakolik je to vlivem působení ultrazvuku není možné určit, protože tyto autoři výsledky nesrovnávají s usazováním bez ultrazvuku. Někteří autoři nepoužívají sonifikaci vůbec [17, 28], přesto nezmiňují žádné problémy se stabilitou kolon.

1.3 Náplň

1.3.1 Radiální homogenita náplně

V případě, že stacionární fáze není na příčném řezu kolonou homogenní, dochází k rozmývání zóny analytu a snižování separační účinnosti. V zónách s větší mezičásticovou porozitou je mobilní fázi kladen menší odpor, a její rychlost se tak zvyšuje. Větší porozita zároveň znamená menší podíl stacionární fáze oproti mobilní fázi, čímž dochází ke snížení retence analytu. Oba tyto faktory mají za následek rychlejší pohyb analytu kolonou v místech s větší mezičásticovou porozitou [22].

Hlavní proces, který ovlivňuje homogenitu náplně, je takzvaný normální vliv stěny (v literatuře označován jako *wall effect*). V kolonách dochází během plnění a po plnění k vyrovnávání napětí, které je vyvolané třením mezi částicemi a tlakem na ně působícím. Náplň jako celek je částečně tvárná a stlačitelná. To jí umožňuje napětí rozložit po celém svém objemu. V oblastech sousedících se stěnou kolony je ale tato schopnost omezena. Částice jsou tlačeny na stěnu a objevuje se nový zdroj tření. Napětí mezi částicemi v blízkosti stěny je tak vyšší než ve střední části kolony. Výsledkem je vznik dvou zón. V okolí stěny jde o zónu s větší hustotou částic náplně a menší mezičásticovou porozitou. Ve střední části kolony se nachází zóna s větší porozitou a pravidelnějším uspořádáním částic [31]. Tato zóna má přibližně poloviční průměr než kolona [32, 33].

V těsné blízkosti stěny kolony převládá geometrický vliv stěny. Narozdíl od normálního vlivu stěny vzniká čistě z prostorových důvodů, proto se označuje jako geometrický. Stěna kolony je pevná a nepohyblivá, částice s ní sousedící tedy nemají jinou možnost, než vytvořit pravidelnou vrstvu. Poměrně velké mezičásticové póry díky stěně navíc nemohou být vyplněny jinými částicemi, jako tomu je ve střední části kolony. Následně vzniká v blízkosti stěny zóna větších mezičásticových pórů. Tato zóna sahá do středu kolony na vzdálenost až 40 částic [33]. Geometrický vliv stěny zcela převládá nad normálním vlivem stěny u kolon s vnitřním průměrem menším než přibližně 10 částic použité stacionární fáze. V dnešní době to obvykle znamená kolony o vnitřním průměru menším než 50 μm . V takovém případě zóna větších pórů zabírá

celou šířku kolony. Kolona je tak vlastně na příčném řezu homogenní. Proto kolony s malým vnitřním průměrem dosahují vysokých separačních účinností [21, 22].

Řešením, jak omezit geometrický vliv stěny v kolonách s vnitřním průměrem větším než 50 μm , je použití stacionárních fází s nepravidelnými částicemi a se širší distribucí velikostí částic. Menší částice pak mohou vyplnit prostor mezi většími, čímž je dosaženo homogennější náplně [3]. Dojde ale zároveň ke snížení celkové porozity a k nárůstu zpětného tlaku.

1.3.2 Axiální homogenita náplně

Hustota částic náplně se podél kolony připravené suspenzním plněním mění. Částice na konci kolony jsou na místo tlačeny vysokým průtokem plnicí fáze a mají nejdelší dráhu. Jsou tedy schopny dosáhnout největší rychlosti. Blízkost frity a malý objem náplně omezuje schopnost vyrovnávat napětí mezi částicemi. S postupujícím plněním se náplň zvětšuje. Dochází k lepšímu vyrovnávání napětí. Zároveň se snižuje průchodnost kolony, následně i průtok plnicí fáze a rychlost částic. V poslední fázi plnění se formuje náplň na začátku kolony. Zde se částice pohybují po nejkratší dráze a tedy nejnižší rychlostí. S klesající rychlostí částic během procesu plnění klesá také hustota náplně.

Vliv axiální heterogenity náplně na separační účinnost studoval Wong a kolektiv [28]. Používali 5 cm dlouhé trubičky, ze kterých skládali kolony různých délek. Tyto kolony byly po naplnění testovány jak vcelku, tak po jednotlivých částech. Bylo zjištěno, že separační účinnost se ve střední části kolony téměř nemění. U delších kolon (15 cm a více) nastává zhoršení účinnosti na konci kolony. Podle Wonga jsou vysvětlením první záběry pumpy, při kterých narůstá tlak až o 20 MPa. Nárůst je nepravidelný a částice ještě nejsou zcela usazeny. Díky rychle narůstajícímu sloupci náplně ale nemají čas nalézt ideální místo, a proto je kvalita náplně celkově nižší. Nejhorší separační účinnost má vstupní část kolony. Náplň zde má nejnižší hustotu a je nejméně kompaktní. Plnicí fáze na náplň naráží přímo a dochází k tvorbě různých kanálů. Ke stejným závěrům dospěla i dřívější studie, která sledovala chování zóny analytu pomocí nukleární magnetické resonance [34].

1.4 Testování kolon

Separační účinnost kolony je charakterizována počtem teoretických pater. Lze jej spočítat ze šířky píku a retenčního času, jak ukazuje rovnice (1)

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (1)$$

kde n je počet teoretických pater, t_R [min] je retenční čas dané látky, w_b [min] je šířka píku při základně a $w_{1/2}$ [min] je šířka píku v polovině jeho výšky. Pro porovnání kolon různých délek je nutné počet teoretických pater převést na výškový ekvivalent teoretického patra podle rovnice (2)

$$H = \frac{L}{n} \quad (2)$$

kde H je výškový ekvivalent teoretického patra [mm], L je délka kolony [mm] a n počet teoretických pater. Na výškový ekvivalent teoretického patra mají vliv tři faktory. Vřířivá difúze je způsobena rozdílnými cestami, které musí jednotlivé molekuly analytu urazit v pórech stacionární fáze. Podélná molekulová difúze vzniká pohybem molekul analytu z místa o vyšší koncentraci do míst s nižší koncentrací. Odpor proti převodu hmoty zahrnuje transportní děje v mobilní a stacionární fázi. Pomocí těchto faktorů lze vyjádřit závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární průtokové rychlosti, takzvanou van Deemterovu křivku. Její tvar ukazuje rovnice (3)

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m) \cdot u \quad (3)$$

kde H je výškový ekvivalent teoretického patra [mm], A je koeficient vlivu vřířivé difúze, B je koeficient vlivu podélné molekulové difúze, u je lineární rychlost mobilní fáze [cm min^{-1}], C_s je koeficient vlivu odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi a C_m je koeficient vlivu odporu proti přenosu hmoty v mobilní fázi.

1.4.1 Separační impedance

Vysoká separační účinnost automaticky neřadí kolonu mezi kvalitní. Skutečně kvalitní kolona musí dosahovat vysoké separační účinnosti při krátké době analýzy a nízkém provozním tlaku. Nejjednodušším vyjádřením této kvality je takzvaný index výkonu p (*performance index*), definován rovnicí (4).

$$p = \frac{n}{t_R} \cdot \frac{n}{\Delta p} \quad (4)$$

p je index výkonu, n počet teoretických pater, t_R retenční čas příslušného analytu [s] a Δp je tlakový spád [Pa]. Bristow a Knox [35] tento vztah rozšířili o viskozitu mobilní fáze a retenční faktor příslušného analytu. Tím získali bezrozměrnou separační impedanci, což je veličina mnohem lépe charakterizující kinetickou kvalitu kolony. S rostoucí kvalitou kolony separační impedance klesá. Příslušný vztah je uveden v rovnici (5).

$$E = \frac{1}{p h (1 + k)} \quad (5)$$

E je separační impedance, p index výkonu [$\text{Pa}^{-1} \text{s}^{-1}$], h viskozita mobilní fáze [Pa s] a k retenční faktor analytu. Výhodou separační impedance je dvojitý způsob vyjádření. Lze ji vypočítat jak z veličin absolutních, tak z veličin redukovaných (vztažených na velikost částice stacionární fáze). Umožňuje tedy porovnat kolony naplněné různými stacionárními fázemi a při použití různých mobilních fází. Rovnici (5) lze úpravami zjednodušit na rovnici (6), která ukazuje obě možnosti vyjádření.

$$E = \frac{H^2}{K} = h^2 \cdot f \quad (6)$$

E je separační impedance, H je výškový ekvivalent teoretického patra [m], K je permeabilita kolony [m^2], h je redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra a f je

odpor proti toku mobilní fáze. Permeabilita kolony je vztah mezi lineární rychlostí mobilní fáze a tlakovým spádem kolony. Závisí na použité mobilní fázi a na délce kolony, jak je vidět z rovnice (7).

$$K = \frac{u h L}{\Delta p} \quad (7)$$

K je permeabilita kolony [m^2], u lineární rychlost mobilní fáze [m s^{-1}], η viskozita mobilní fáze [Pa s], L délka kolony [m] a Δp tlakový spád [Pa]. Odpor proti toku mobilní fáze f by se měl pohybovat v rozsahu 500–1000, kde 500 je nejlepší hodnota. Za vynikající redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra h je považována hodnota 2. Dosazením tedy získáme jako ideální hodnotu separační impedance 2000. V absolutních číslech to pro kolonu plněnou částicemi $5 \mu\text{m}$ znamená výškový ekvivalent teoretického patra $H = 1 \cdot 10^{-5} \text{ m}$ a permeabilitu $5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$.

1.4.2 Waltersův test

Aby bylo usnadněno porovnávání různých ODS (oktadecylem modifikovaný silikagel) kolon, standardizoval Walters v roce 1987 dříve používané testy [36]. Pro hydrofobní interakce s oktadecylovými zbytky zavedl index hydrofobicity HI . Hydrofilní interakce vyjádřil pomocí indexu volných silanolových skupin SI . Oba parametry jsou počítány z retenčních faktorů vybraných látek podle následujících rovnic.

$$HI = \frac{k_{anthracen}}{k_{benzen}} \quad (8)$$

$$SI = \frac{k_{DETA}}{k_{anthracen}} \quad (9)$$

HI je index hydrofobicity, $k_{anthracen}$ retenční faktor anthracenu, k_{benzen} retenční faktor benzenu, *SI* index volných silanolových skupin a k_{DETA} retenční faktor N,N-diethyl-*m*-toluamidu. Vyšší index hydrofobicity představuje větší pokrytí silikagelu oktadecylovými zbytky, a tedy větší afinitu stacionární fáze k nepolárním látkám. Vysoký index volných silanolových skupin znamená, že stacionární fáze nebyla ošetřena tzv. end-cappingem a obsahuje velké množství volných silanolových skupin. Silně polární sloučeniny, například aminy, budou patrně na takové stacionární fázi poskytovat rozmyté a deformované píky. Walters dělí oba indexy podle hodnoty do tří kategorií, jak uvádí tabulka 1.

Tabulka 1 Kritéria pro zařazení kolon do skupin podle Waltersových indexů

Index	Hodnota	Kategorie
<i>HI</i>	< 3,6	nízká
	3,6–4,0	střední
	> 4,0	vysoká
<i>SI</i>	< 0,9	nízká
	0,9–1,2	střední
	> 1,2	vysoká

2 Cíl práce

Prvním cílem této práce je najít podmínky pro úspěšné naplnění kapilárních kolon metodou suspenzního plnění. Druhým cílem je určit vliv těchto podmínek na separační účinnost a celkovou kvalitu kolon. Třetím cílem je pomocí získaných údajů zjistit, zda je možné naplnit dostatečně kvalitní kolony za jednodušších podmínek, než jsou podmínky běžně popisované v literatuře.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Kolony byly plněny stacionární fází Nucleosil C18, velikost částic 3 a 5 μm (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Pro přípravu suspenze a plnicí a mobilní fáze byl použit acetonitril, čistota pro HPLC, LiChrosolv (Merck, Darmstadt, Německo). Pro testování kolon byla použita thiomočovina, čistá (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), fenol, p.a. (Penta, Praha, Česká republika) a toluen, čistý (Merck, Darmstadt, Německo). Pro Waltersův test byl použit anthracen, čistý (Fluka, Buchs, Švýcarsko), benzen, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a N,N-diethyl-*m*-toluamid, 98,3% (Chem Service, West Chester, USA).

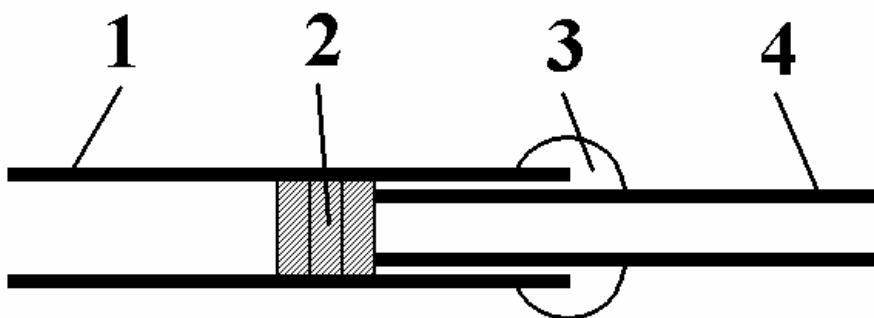
3.2 Použité přístroje

Veškerá vážení byla prováděna na analytických vahách XE-100A (Denver Instruments, Denver, USA). Pro plnění byla použita ultrazvuková lázeň Elmasonic S 15 H (P-Lab, Praha, Česká republika) a izokratická pumpa LCP 4000 (Ecom, Praha, Česká republika). HPLC systém pro testování kolon sestával z pístové pumpy 100DM (Isco, Lincoln, USA), dávkovacího kohoutu o objemu 100 nl (Valco Instruments, Schenkon, Švýcarsko) a dvoukanálového spektrofotometrického detektoru UVIS-205 (Linear Instruments, San Jose, USA). Chromatogramy byly zaznamenány a vyhodnoceny pomocí programu Clarity 2.4.4.105 (Data Apex, Praha, Česká republika). Naměřená data byla prokládána van Deemterovými křivkami v programu Origin 6.0.

3.3 Příprava kolon

Pro přípravu kolon byly použity křemenné kapiláry o vnitřním průměru 320 μm , vnějším průměru 450 μm a přibližné délce 23 cm. Na konec každé z nich byla následujícím způsobem umístěna frit. Tělo kolony bylo zabodnuto do filtru ze skelné vaty a otáčením byla část filtru vyříznuta. Pomocí zakončovací kapiláry (vnitřní průměr 75 μm a vnější průměr 280 μm) poté byla skelná vata vsunuta přibližně 1 cm do těla

kolony. Tento proces byl u každé kolony proveden celkem třikrát. Pro zajištění frity byla na konec kolony epoxidovou pryskyřicí vlepena asi 5 cm dlouhá zakončovací kapilára. Pryskyřice byla ponechána zaschnout do následujícího dne. Schéma zakončení kolony je uvedeno na obrázku 2.

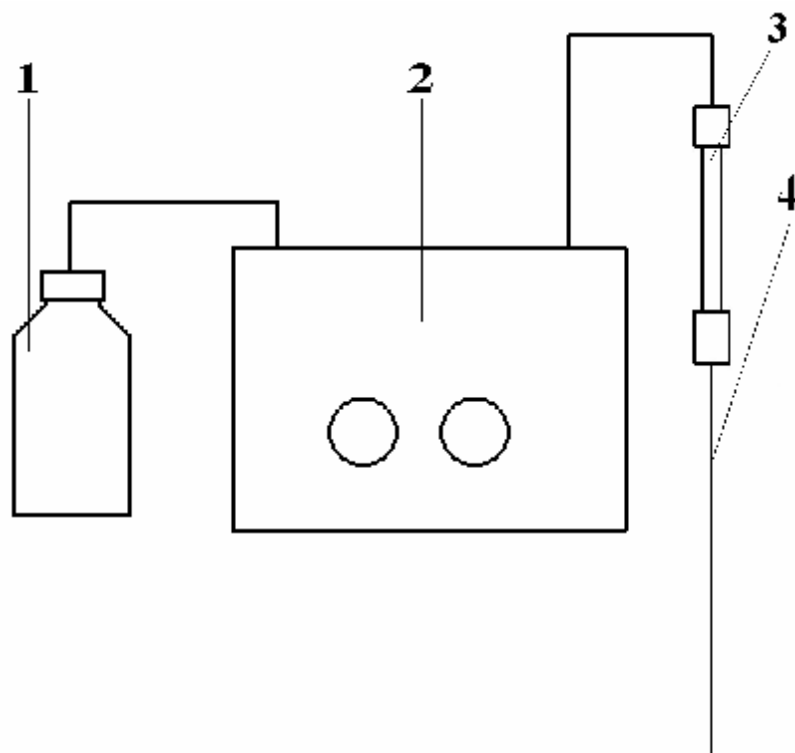


Obr 2 Zakončení kolony: (1) kolona, (2) frita, (3) epoxidová pryskyřice, (4) zakončovací kapilára.

3.4 Plnění kolon

Schéma plnění aparatury je uvedeno na obrázku 3. Kapilára připravená pro plnění byla pomocí PEEKové trubičky a šroubu připojena k zásobníku suspenze a promyta plnicí fází ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 % obj.). Pouze u kolony Katka bylo díky vyššímu tlaku nutno k připojení k zásobníku použít kovový šroub a PEEKovou feruli. Poté byl zásobník vyprázdněn. Suspenze stacionární fáze v acetonitrilu o koncentraci $0,05 \text{ g cm}^{-3}$ byla 10 minut sonifikována v ultrazvukové lázni a naplněna do zásobníku. Následně byla suspenze pumpována skrz kapiláru. Pro plnění všech kolon byl počáteční průtok nastaven na $0,3 \text{ ml min}^{-1}$, pouze u kolony Iveta byl nastaven na $0,6 \text{ ml min}^{-1}$, a u kolony Katka na $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Po dosažení plnicího tlaku byl průtok snížen tak, aby byl plnicí tlak udržen.

Po naplnění kolony byl tlak udržován ještě po určitou dobu, aby došlo k řádnému usazení stacionární fáze. Zároveň byly některé kolony umístěny v ultrazvukové lázni a sonifikovány. Použité tlaky a doby usazování a sonifikace uvádí tabulka 2. Poté byl nastaven průtok $0,01 \text{ ml min}^{-1}$. Po poklesu tlaku na přibližně 20 MPa byla pumpa vypnuta a kolona byla ponechána, než tlak poklesl na hodnotu atmosférického tlaku.



Obr. 3 Plnící aparatura: (1) zásobník plnící fáze, (2) pumpa, (3) zásobník suspenze, (4) kolona.

Tabulka 2 Podmínky plnění kapilárních kolon

Označení kolony ^{a)}	Tlak při plnění MPa	Tlak při usazování MPa	Doba usazování min	Doba sonifikace min	Velikost částic μm
Iva, Iveta	30	33	5	–	5
Eva, Fiona, Gertruda, Helenka	30	33	15	–	5
Eliška, Františka, Ginny, Hanka	30	33	15	10	5
Jana	30	33	30	–	5
Jitka, Jarka	30	33	30	25	5
Klára	20	20	5	–	5
Katka	40	40	5	–	5
Oksana	30	33	5	–	3
Petra	30	33	15	–	3

a) – kolony v této práci jsou označeny ženskými jmény

3.5 Testování kolon

Testování separační účinnosti kolon probíhalo formou měření van Deemterovy křivky a výpočtem separační impedance. Jako mobilní fáze byla použita směs $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.). Dávkováno bylo 100 nl vzorku. Značkovačem mrtvého času byla thiomočovina o koncentraci 1 mg cm^{-3} . Ke zjištění počtu teoretických pater byl použit fenol a u některých kolon také toluen, oba o koncentraci 10 mg cm^{-3} . Měření probíhalo v módu konstantního tlaku, použitý tlak se pohyboval v rozmezí 0,6 – 9 MPa. Detekční kapilára měla vnitřní průměr 100 μm , ke koloně byla připojena teflonovou převlečnou trubičkou. Spektrofotometrická detekce byla paralelní při vlnových délkách 214 a 254 nm.

K otestování vlastností stacionární fáze byl použit tzv. Waltersův test [36]. Pro zjištění indexu volných silanolových skupin byl použit CH_3CN jako mobilní fáze a jako testovací látky N,N-diethyl-*m*-toluamid o koncentraci $1 \mu\text{l cm}^{-3}$ a anthracen o koncentraci $10 \mu\text{g cm}^{-3}$. Při zjišťování indexu hydrofobicity byla jako mobilní fáze použita směs $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.). Analyty byly benzen o koncentraci $2 \mu\text{l cm}^{-3}$ a anthracen o koncentraci $10 \mu\text{g cm}^{-3}$. V obou případech byla nezadržujícím se analytem thiomočovina o koncentraci $15 \mu\text{g cm}^{-3}$.

4 Výsledky a diskuse

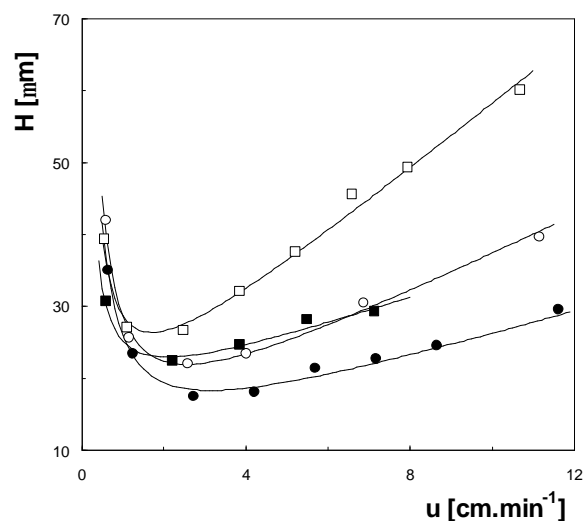
V této diplomové práci bylo naplněno celkem 17 kolon stacionární fáze Nucleosil C18, z toho 15 kolon částicemi o průměru 5 μm a 2 kolony částicemi o průměru 3 μm . Podmínky plnění byly voleny tak, aby bylo možno sledovat jejich vliv na separační účinnost a celkovou kvalitu kolon. Jednalo se o vliv tlaku, doby usazování náplně, rychlosti plnění a zejména o vliv sonifikace, tedy podmínky v literatuře doposud nepopsané.

Permeabilita kolony se s provozním tlakem téměř nemění, a tudíž je separační impedance pro danou kolonu závislá především na hodnotě výškového ekvivalentu teoretického patra. Při porovnávání různých kolon je tedy v první řadě nutné určit při jakých podmínkách bude tato hodnota naměřena. Lze použít hodnoty měřené při stejném tlaku, lineární rychlosti mobilní fáze nebo době analýzy. V této práci byla u každé kolony vypočtena separační impedance při ideální provozní lineární rychlosti mobilní fáze. Ta byla určena z van Deemterovy křivky jako rychlost o něco větší než rychlost v minimu křivky. Pro většinu kolon tato rychlost odpovídala tlaku 3 MPa a její hodnota se pohybovala kolem 5 cm min^{-1} . Přesné hodnoty jsou uvedeny v příslušných tabulkách.

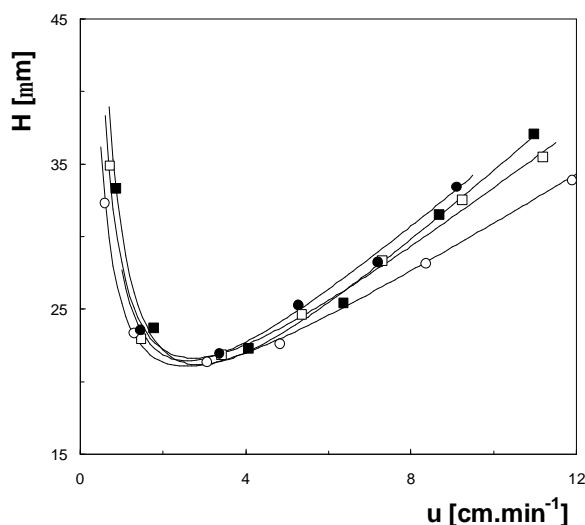
4.1 Vliv sonifikace

4.1.1 Sonifikace 10 minut

Nejprve byla zkoumána reprodukovatelnost plnění. K tomu byly využity kolony sérií E až H. Vždy jedna kolona z dané série byla při usazování stacionární fáze vložena na 10 minut do ultrazvukové lázně, zatímco druhá ne (viz tabulka 2 v oddíle 3.4). Usazování trvalo 15 minut při tlaku 33 MPa. Testovací látkou byl fenol o koncentraci 10 mg cm^{-3} . Příslušné van Deemterovy křivky ukazují obrázky 4 a 5.



Obr. 4 Van Deemterovy křivky pro kolony plněné za pomoci sonifikace. (□) Eliška, (○) Františka, (●) Ginny, (■) Hanka. Testovací látka fenol, mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.), UV detekce při 214 nm.



Obr. 5 Van Deemterovy křivky pro kolony plněné bez sonifikace. (■) Eva, (□) Fiona, (○) Gertruda, (●) Helenka. Testovací látka fenol, mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.), UV detekce při 214 nm.

Všechny kolony plněné bez použití ultrazvukové lázně vykazovaly téměř stejný tvar van Deemterovy křivky. Nejnižší dosažený výškový ekvivalent teoretického patra byl asi 22 μm , což odpovídá redukované hodnotě 4,4. To je přibližně dvojnásobek ideální hodnoty. Oproti tomu kolony plněné s použitím ultrazvukové lázně vykazovaly v počtech teoretických pater velké rozdíly. Minimální výškové ekvivalenty teoretických

pater se pohybovaly v rozmezí 18 – 26 μm . Zároveň se výrazně liší tvary křivek. Sonifikace tedy do procesu usazování vnáší jistý náhodný prvek, což za těchto podmínek znemožňuje reprodukovatelné plnění. Navíc průměrný výškový ekvivalent teoretického patra je o něco vyšší než u kolon plněných bez sonifikace.

Tabulky 3 a 4 uvádějí hodnoty permeabilit a separačních impedancí. Sonifikované kolony mají oproti kolonám nesonifikovaným menší permeabilitu. To naznačuje těsnější usazení částic stacionární fáze, což je zcela v souladu s dosavadními výzkumy [3]. Hodnoty separačních impedancí potvrzují závěry získané z van Deemterových křivek. Kolony nesonifikované mají separační impedance téměř stejné, s rozptylem menším než 2000 a relativní směrodatnou odchylkou 6 %. Separační impedance sonifikovaných kolon se liší velmi výrazně, relativní směrodatná odchylka dosahuje 66 %. Průměrná hodnota impedance je navíc přibližně o 5000 vyšší než u kolon nesonifikovaných.

Tabulka 3 Separační impedance kolon plněných za pomoci sonifikace. Všechny hodnoty byly naměřeny při tlaku 3,00 MPa.

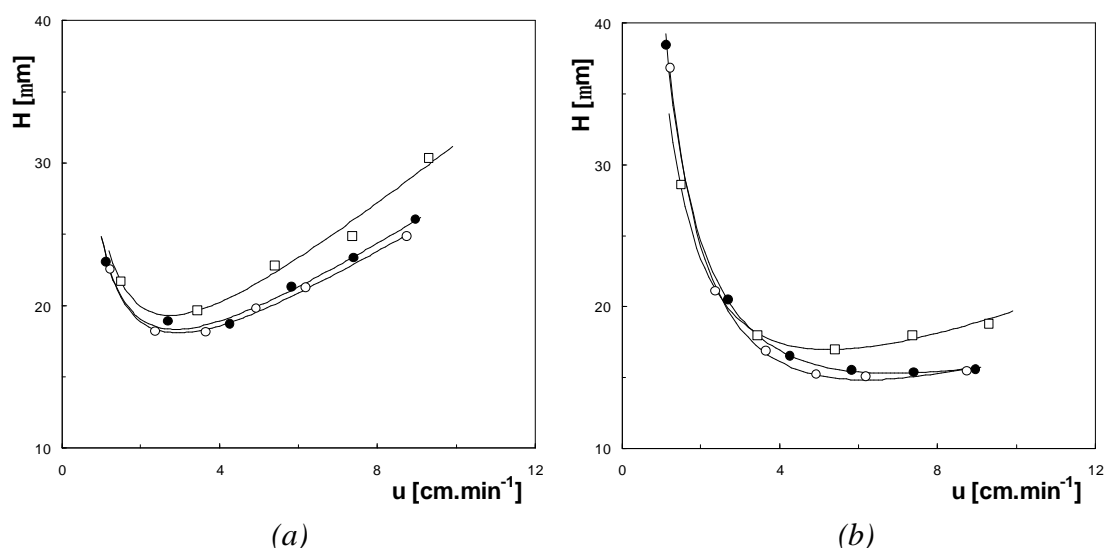
Kolona	u cm min^{-1}	K 10^{-14} m^2	E
Eliška	3,8	3,30	34200
Františka	4,0	3,58	15500
Ginny	4,2	3,77	8800
Hanka	4,1	3,77	16200

Tabulka 4 Separační impedance kolon plněných bez sonifikace. Všechny hodnoty byly naměřeny při tlaku 3,00 MPa.

Kolona	u cm min^{-1}	K 10^{-14} m^2	E
Eva	6,4	4,82	12900
Fiona	5,4	4,37	13900
Gertruda	4,8	3,81	14600
Helenka	5,3	4,74	13500

4.1.2 Sonifikace 25 minut

Lze předpokládat, že delším působením ultrazvuku při usazování stacionární fáze by mělo dojít k odstranění náhodného prvku, a tím ke zvýšení reprodukovatelnosti plnění. Tento předpoklad byl ověřen na kolonách série J, plněných za stejných podmínek jako u série E až H. Rozdíl byl pouze v době usazování náplně, která byla 30 minut. Dvě kolony byly zároveň 25 minut sonifikovány (viz tabulka 2). Jako testovací látky byly použity fenol a toluen o koncentracích 10 mg cm^{-3} .



Obr. 6 Van Deemterovy křivky pro kolony s usazováním náplně 30 min. Testovací látky (a) fenol a (b) toluen.
(□) Jana (bez sonifikace), (○) Jitka (sonifikována), (●) Jarka (sonifikována), mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.), UV detekce při 214 nm.

Pro obě testované látky dosahují kolony, které byly během usazování náplně sonifikovány, téměř identických van Deemterových křivek (viz obrázek 6). Výškový ekvivalent teoretického patra je nižší než u nesonifikované kolony, a to o $1 \mu\text{m}$ pro fenol a o $2 \mu\text{m}$ pro toluen. Redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra má hodnotu přibližně 3,5. Delším působením ultrazvuku při plnění je tedy skutečně možné dosáhnout větší separační účinnosti kolony.

Kolony sonifikované 25 minut, stejně jako kolony sonifikované 10 minut, mají nižší permeabilitu (viz tabulka 5), a to natolik, že k dosažení ideální provozní průtokové rychlosti je nutno působit tlakem o 1 MPa vyšším než u kolony nesonifikované. Proto jsou hodnoty separačních impedancí všech tří kolon srovnatelné a u kolony Jana je dokonce separační impedance nejmenší. Na celkovou kvalitu kolony při třicetiminutovém usazování stacionární fáze tedy použití ultrazvukové lázně nemá vliv.

Tabulka 5 *Separací impedance kolon plněných po dobu 30 minut.*

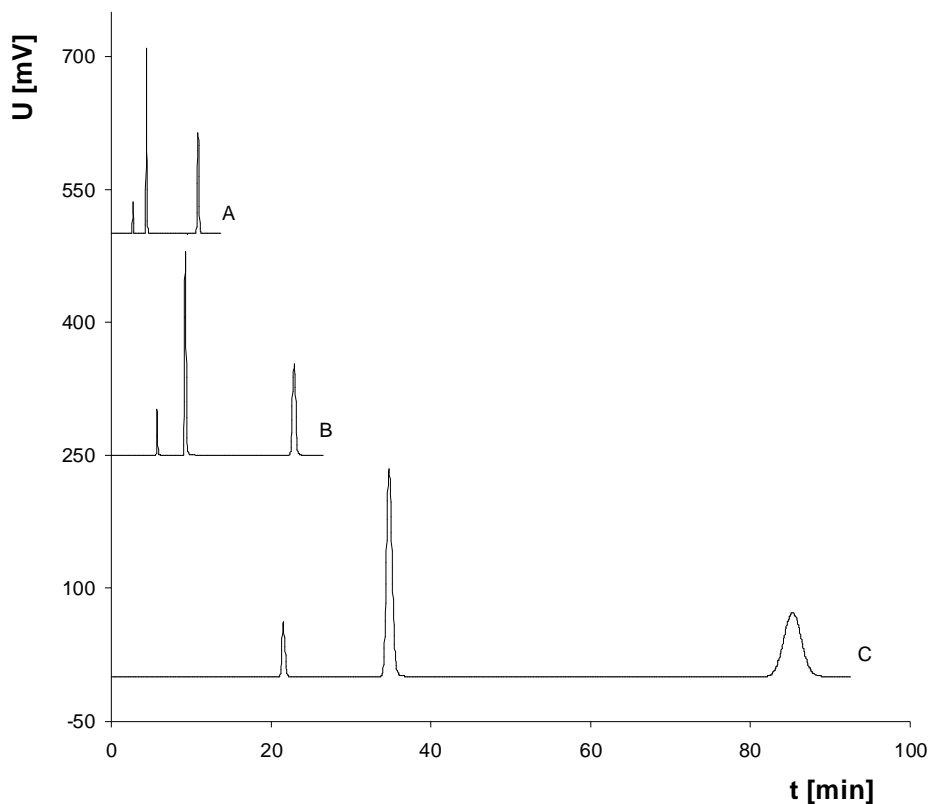
Kolona	p MPa	u cm min^{-1}	K 10^{-14} m^2	E fenol	E toluen
Jana ^{a)}	3,00	5,4	5,01	10300	5700
Jarka ^{b)}	4,00	5,8	4,02	11300	6000
Jitka ^{b)}	4,00	4,9	3,61	10900	6400

a) – kolona plněná bez sonifikace

b) – kolona plněná s pomocí sonifikace

Z výsledků této práce vyplývá, že aby došlo ke zlepšení reprodukovatelnosti plnění a separační účinnosti kolon, je nutné nechat náplň usazovat nejméně 30 minut za pomoci ultrazvukové lázně. Tako připravené kolony ale mají nižší permeabilitu, a tedy vyšší provozní tlak. Separací impedance zůstává přibližně stejná jako u kolon nesonifikovaných během usazování náplně.

Na obrázku 7 jsou zobrazeny testovací chromatogramy kolony Jarka v různých částech van Deemterovy křivky. Chromatogram (A) byl naměřen při tlaku 6,00 MPa ve vzestupné (pravé) části křivky, kde díky vysoké rychlosti mobilní fáze převažuje odpor proti přenosu hmoty. Chromatogram (B) přibližně odpovídá minimu van Deemterovy křivky, naměřen byl při tlaku 3,00 MPa. Chromatogram (C) pochází ze sestupné (levé) části křivky. Zde výrazně převažuje podélná molekulová difúze, separační účinnost kolony klesá a doba analýzy roste.



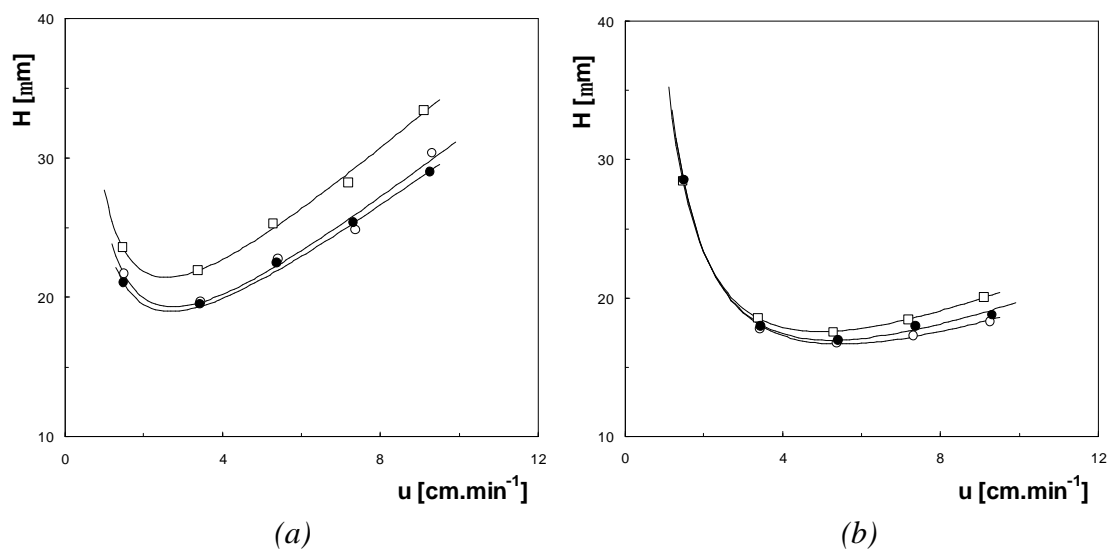
Obr. 7 Testovací chromatogramy naměřené na koloně Jarka za konstantního tlaku (A) 6,00 MPa, (B) 3,00 MPa, (C) 1,00 MPa. Testovací látky eluují v pořadí thiomocovina, fenol, toluen. Mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.), UV detekce při 214 nm.

4.2 Vliv doby usazování stacionární fáze

Další faktor, který může mít vliv na výslednou účinnost kolony je doba, po kterou je stacionární fáze ponechána usazovat. V této práci byly srovnávány tři kolony, jejichž příprava se lišila pouze dobou usazování náplně (5, 15 a 30 minut). Ultrazvuková lázeň nebyla ani u jedné kolony použita. Testovacími látkami byly opět fenol a toluen o koncentracích 10 mg cm^{-3} .

Na obrázku 8 jsou zobrazeny van Deemterovy křivky testovaných kolon. Pro obě látky se průběh křivek u kolon Iva a Jana téměř neliší. Nejnižší dosažený výškový ekvivalent teoretického patra je $19 \mu\text{m}$ (redukovaná hodnota 3,8) pro fenol a $17 \mu\text{m}$ (redukovaná hodnota 3,4) pro toluen. Kolona Helenka má minimum pro fenol vyšší asi

o 2 μm a pro toluen asi o 1 μm . Na separační účinnost tedy doba usazování nemá vliv, jak vyplývá z experimentálních výsledků této práce.



Obr. 8 Van Deemterovy křivky kolon v závislosti na době usazování náplně. Testovací látky (a) fenol a (b) toluen.

(●) Iva (usazování 5 minut), (□) Helenka (usazování 15 minut), (○) Jana (usazování 30 minut), mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.), UV detekce při 214 nm.

Údaje uvedené v tabulce 6 potvrzují závěry získané z van Deemterových křivek. Kolony Iva a Jana mají téměř shodné hodnoty permeabilit i separačních impedancí. Kolona Helenka má hodnoty o trochu horší, ale stále srovnatelné. Doba usazování neovlivňuje ani celkovou kvalitu kolony, a k úspěšnému naplnění tak stačí minimální doba přípravy kolony.

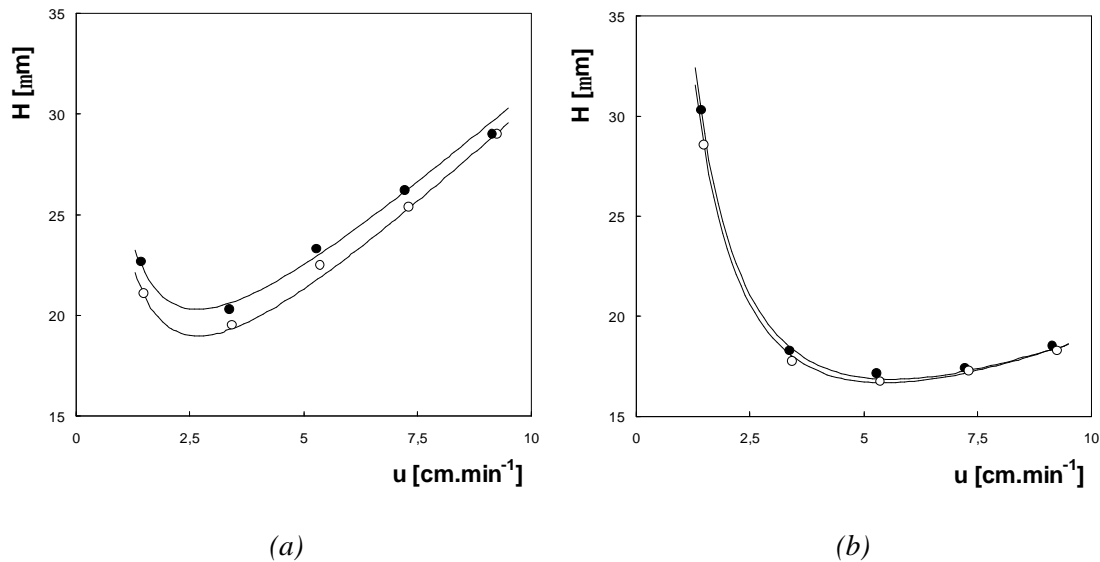
Tabulka 6 Separační impedance kolon v závislosti na době usazování náplně. Všechny hodnoty byly naměřeny při tlaku 3,00 MPa.

Kolona	Doba usazování náplně min	u cm min^{-1}	K 10^{-14} m^2	E fenol	E toluen
Iva	5	5,4	5,02	10100	5600
Helenka	15	5,3	4,74	13500	6500
Jana	30	5,4	5,01	10300	5700

4.3 Vliv rychlosti plnění

Vliv rychlosti plnění na kvalitu kolony byl zkoumán na kolonách série I. V obou kolonách byla stacionární fáze usazována 5 minut při tlaku 33 MPa. Ultrazvuková lázeň nebyla použita. Kolona Iva byla plněna průtokem $0,3 \text{ ml min}^{-1}$. Plnicího tlaku 30 MPa bylo dosaženo přibližně po naplnění dvou třetin kolony. Pro kolonu Iveta byl průtok nastaven na $0,6 \text{ ml min}^{-1}$, plnicí tlak tak dosáhl hodnoty 30 MPa po naplnění přibližně dvou pětin kolony. Doba plnění byla oproti koloně Iva kratší asi o jednu minutu.

Van Deemterovy křivky, uvedené na obrázku 9, ukazují velice podobnou separační účinnost obou kolon. Nejnižší výškový ekvivalent teoretického patra pro toluen je u obou kolon $17 \text{ } \mu\text{m}$, tedy 3,4 v redukovaných hodnotách. Při použití fenolu jako testovací látky má kolona Iveta minimální výškový ekvivalent teoretického patra přibližně $21 \text{ } \mu\text{m}$, kolona Iva o $2 \text{ } \mu\text{m}$ méně (redukované hodnoty 4,2 a 3,8). Tato práce prokázala, že zvýšení rychlosti plnění nemá významný vliv na separační účinnost kolony.



Obr. 9 Van Deemterovy křivky kolon v závislosti na rychlosti plnění. Testovací látky (a) fenol a (b) toluen.

(●) Iveta ($0,6 \text{ ml min}^{-1}$), (○) Iva ($0,3 \text{ ml min}^{-1}$), mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.), UV detekce při 214 nm .

Tabulka 7 shrnuje získané hodnoty separačních impedancí a permeabilit kolon série I. Kolona Iveta má všechny parametry o trochu horší (nižší permeabilitu a vyšší separační impedanci) než kolona Iva. Možným vysvětlením je, že při nižší rychlosti plnění a pomalejším nárůstu tlaku mají částice stacionární fáze více času na nalezení ideálního umístění ve vztahu k ostatním částicím. To by mělo za následek vytvoření stabilnějšího lože. Rozdíl v kvalitě obou kolon ale není příliš velký a může být přičten i náhodným faktorům. Pro potvrzení tohoto předpokladu je tedy potřeba další studie, ve které by byly použity kolony s širším rozsahem rychlostí plnění.

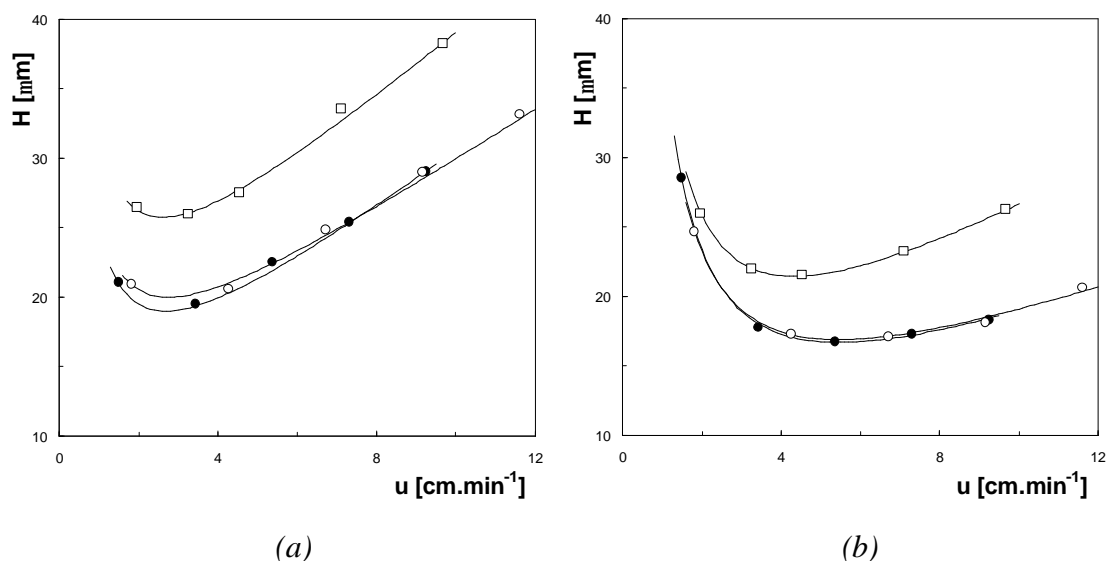
Tabulka 7 Separační impedance kolon v závislosti na rychlosti plnění. Všechny hodnoty byly naměřeny při tlaku 3,00 MPa.

Kolona	Rychlost plnění ml min^{-1}	u cm min^{-1}	K 10^{-14} m^2	E fenol	E toluen
Iva	0,3	5,4	5,02	10100	5600
Iveta	0,6	5,3	4,49	12100	6600

4.4 Vliv tlaku

Posledním zkoumaným faktorem byl vliv tlaku. Byla porovnávána trojice kolon plněných při tlaku 20, 30 a 40 MPa. Usazování stacionární fáze trvalo 5 minut bez použití ultrazvukové lázně.

Kolony Iva a Klára vykazují téměř stejný průběh van Deemterových křivek pro obě látky (viz obrázek 10). Minimální hodnota pro fenol je 19 μm (Iva), respektive 20 μm (Klára). Tedy redukovaná hodnota přibližně 4. Pro toluen mají obě kolony nejnižší výškový ekvivalent teoretického patra přibližně 17 μm (redukovaná hodnota 3,4). Kolona Katka, plněná při tlaku 40 MPa, má van Deemterovy křivky posunuté výše. Minimum křivky pro fenol má hodnotu 26 μm , pro toluen 22 μm . Redukované ekvivalenty teoretických pater tak jsou 5,2 a 4,3. Kolona Katka vykazuje nejhorší hodnoty ze všech testovaných kolon.



Obr. 10 Van Deemterovy křivky kolon v závislosti na plnicím tlaku. Testovací látky (a) fenol a (b) toluen.
 (□) Katka (40 MPa), (●) Iva (30 MPa), (○) Klára (20 MPa), mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.), UV detekce při 214 nm.

Z porovnání údajů v tabulce 8 vyplývá, že kvalita kolon klesá s nárůstem plnicího tlaku. Lze to vysvětlit obdobně jako u vlivu rychlosti plnění (viz oddíl 4.3). Nižšího tlaku je dosaženo nižším průtokem plnicí fáze. Celé plnění probíhá pomaleji a částice tak mají více času na vytvoření stabilního lože. Nej kvalitnější kolonou z této trojice je Klára. Její separační impedance pro fenol je nejnižší ze všech testovaných kolon, separační impedance pro toluen je druhá nejnižší. Hodnotu permeability $5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$ přesáhly pouze tři další kolony. Kolona Katka má nejvyšší permeabilitu ze všech testovaných kolon, ale hodnota separační impedance je podprůměrná. Patrně tedy došlo ke zmenšení funkčního povrchu částic a usnadnění průchodu analytů kolonou. Důvodem může být vytvoření trhlin v loži stacionární fáze, jak se často děje v horní části náplňových kolon [28]. Druhým důvodem by mohl být fakt, že použitá stacionární fáze je staršího data výroby. Je tedy možné, že její částice nemají dostatečně velkou odolnost proti tlaku a došlo ke kolapsu a zablokování vnitřních pórů.

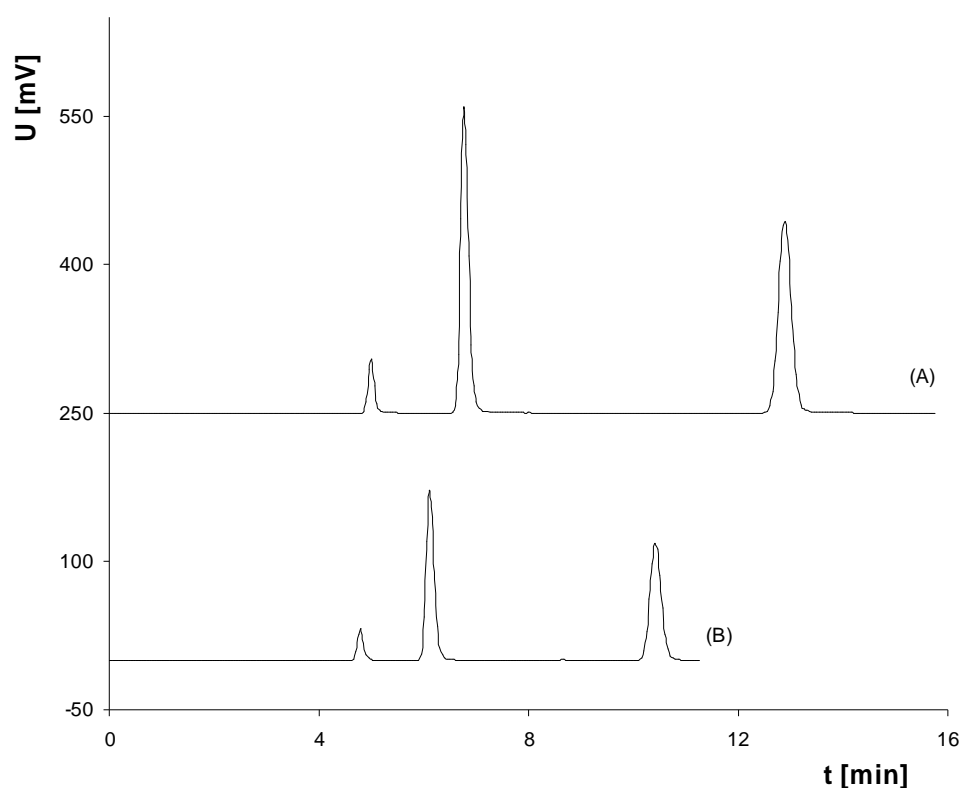
Tabulka 8 Separační impedance kolon v závislosti na plnicím tlaku.

Kolona	Plněno při tlaku MPa	u cm min ⁻¹	K 10 ⁻¹⁴ m ²	E fenol	E toluen
Katka ^{a)}	40	4,5	5,70	13300	8100
Iva ^{b)}	30	5,4	5,02	10100	5600
Klára ^{a)}	20	4,3	5,20	8100	5700

a) – měřeno při tlaku 2,00 MPa

b) – měřeno při tlaku 3,00 MPa

Parametry kolon Klára a Katka v tabulce 8 byly počítány z chromatogramů uvedených na obrázku 11. Oba chromatogramy byly naměřeny při tlaku 2,00 MPa přibližně v oblasti minima van Deemterovy křivky. Díky vyšší permeabilitě kolony Katka byla analýza přibližně o dvě minuty kratší, než analýza na koloně Klára za stejných podmínek.

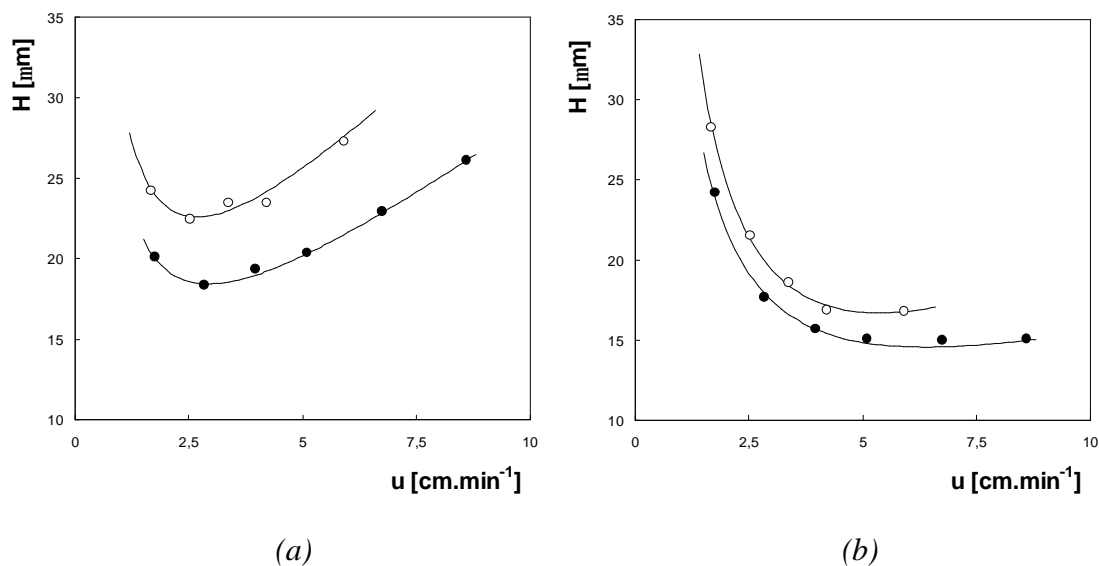


Obr. 11 Testovací chromatogramy naměřené na kolonách (A) Klára a (B) Katka za konstantního tlaku 2,00 MPa. Testovací látky eluují v pořadí thiomočovína, fenol, toluen. Mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.), UV detekce při 214 nm.

4.5 Částice o průměru 3 mm

Pro srovnání byly naplněny dvě kolony částicemi o průměru 3 μm . Náplň byla ponechána usazovat po dobu 5 a 15 minut bez použití ultrazvukové lázně. Redukovaný ekvivalent teoretického patra byl očekáván přibližně stejný jako u kolon s 5 μm částicemi stacionární fáze (tedy v rozmezí 4 – 5 pro fenol a 3 – 4 pro toluen). To znamená přibližně o 1/3 nižší výškový ekvivalent teoretického patra v absolutních hodnotách. Naopak permeabilita byla očekávána nižší, vzhledem k menší mezičásticové porositě náplně.

Jak je zřejmé z křivek na obrázku 12, předpoklad o vyšší účinnosti se nepotvrdil. Kolona Oksana, s dobou usazování náplně 5 minut, má nejnižší hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra 18 μm pro fenol a 15 μm pro toluen (redukované hodnoty 6,0 a 5,0). Separační účinnost kolony Petra, s dobou usazování náplně 15 minut, je horší. Nejnižší výškový ekvivalent teoretického patra pro fenol je 23 μm (redukovaná hodnota 7,7) a pro toluen 17 μm (redukovaná hodnota 5,7).



Obr. 12 Van Deemterovy křivky kolon s náplní 3 mm částic. Testovací látky (a) fenol a (b) toluen.

(●) Oksana, (○) Petra, mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 65:35 (% obj.), UV detekce při 214 nm.

Hodnoty permeability obou kolon (viz tabulka 9) jsou přibližně poloviční proti kolonám s 5 μ m částicemi stacionární fáze. Ideální provozní lineární rychlosti mobilní fáze bylo dosaženo až při tlaku 5 MPa, což potvrzuje původní předpoklady. Díky nižší separační účinnosti tak obě kolony vykazují podprůměrnou separační impedanci. Plnění stacionární fáze s 3 μ m částicemi je tedy náročnější než plnění částic větších. To je zcela v souladu s dřívějšími studiemi [27].

Tabulka 9 *Separační impedance kolon s náplní 3 μ m částic. Měřeno při tlaku 5,00 MPa.*

Kolona	u cm min ⁻¹	K 10 ⁻¹⁴ m ²	E fenol	E toluen
Oksana ^{a)}	5,1	2,57	16200	8800
Petra ^{b)}	4,2	2,21	24900	12900

a) – doba usazování náplně 5 minut

b) – doba usazování náplně 15 minut

4.6 Waltersův test

Indexy hydrofobicity a indexy volných silanolových skupin pro vybrané kolony s náplní částic o průměru 5 μ m jsou uvedeny v tabulce 10. Index hydrofobicity všech kolon, kromě kolony Klára, se pohybuje v rozmezí 3,0 – 3,6, což je řadí do skupiny s nízkým pokrytím oktadecylovými zbytky (viz tabulka 1 v oddíle 1.4.2). Kolona Klára patří do skupiny se středním pokrytím, avšak její hodnota HI je blízká hodnotám HI ostatních kolon. Hraniční hodnotu HI 3,6 přesahuje pouze o 0,07. Průměrný index hydrofobicity všech kolon má hodnotu 3,45. Správnější by tedy bylo všechny kolony řadit na pomezí skupin s nízkým a středním pokrytím oktadecylovými zbytky.

Index volných silanolových skupin mají všechny kolony zkoumané v této práci nižší než 0,9, a patří tedy do skupiny s nízkým podílem. Stacionární fáze tedy byla po navázání oktadecylu dále modifikována.

Tabulka 10 Výsledky Waltersova testu pro kolony s náplní 5 μ m částic. Všechny hodnoty byly měřeny při tlaku 3,00 MPa.

Kolona	<i>HI</i>	<i>SI</i>
Helenka	3,41	0,45
Iva	3,08	0,39
Jana	3,59	0,59
Jitka	3,52	0,45
Katka	3,43	0,56
Klára	3,67	0,31

Tabulka 11 uvádí tyto hodnoty pro kolony plněné částicemi o průměru 3 μ m. Obě kolony mají *HI* vyšší než 4,0. Podle Waltersových kritérií tak mají vysoké pokrytí oktadecylovými zbytky a tedy velkou afinitu k nepolárním analytům. Hodnota *SI*, stejně jako u ostatních testovaných kolon, řadí obě kolony do skupiny s nízkým podílem volných silanolových skupin.

Tabulka 11 Výsledky Waltersova testu pro kolony s náplní 3 μ m částic. Všechny hodnoty byly měřeny při tlaku 5,00 MPa.

Kolona	<i>HI</i>	<i>SI</i>
Oksana	4,07	0,56
Petra	5,03	0,57

5 Závěr

V této diplomové práci byly kapilární kolony o vnitřním průměru 320 μm plněny stacionární fází Nucleosil C18 o velikosti částic 3 μm a 5 μm metodou suspenzního plnění. U připravených kolon byl studován vliv plnicího tlaku, rychlosti plnění, doby usazování náplně a doby sonifikace na separační účinnost a separační impedanci. Bylo připraveno 17 náplňových kapilárních kolon, na nichž bylo provedeno celkem 536 chromatografických experimentů.

Hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra se pro kolony s 5 μm částicemi stacionární fáze pohybovaly mezi 20 – 25 μm pro fenol a 15 – 20 μm pro toluen (redukované hodnoty 4,0 – 5,0 a 3,0 – 4,0 v tomto pořadí). Nejnižší separační účinnosti dosáhla kolona plněná při tlaku 40 MPa. Všechny kolony plněné při tlaku 30 MPa vykazovaly podobné parametry nezávisle na podmínkách plnění. Srovnatelnou separační účinnost měla kolona plněná při tlaku 20 MPa, její separační impedance byla nejnižší, a tedy nejlepší ze všech připravených kolon. Použitím ultrazvukové lázně po dobu 25 minut během usazování náplně bylo dosaženo mírného zvýšení separační účinnosti oproti usazování náplně 5 minut bez ultrazvuku. Zároveň ale klesla permeabilita kolon. Separační impedance, a tím i celková kvalita kolon, zůstala nezměněna. Z této práce jednoznačně vyplývá, že je možné získat kolonu dostačující kvality při použití jednodušších podmínek plnění.

Kolony plněné částicemi o průměru 3 μm vykazovaly stejné hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra jako kolony s částicemi o průměru 5 μm . To znamená redukovaný ekvivalent teoretického patra v rozmezí 7,0 – 8,0 pro fenol a 5,0 – 6,0 pro toluen. Ve spojení s nižší permeabilitou z toho vyplývá vyšší separační impedance, a tedy menší kvalita těchto kolon. Z výše uvedených výsledků je patrné, že takto malé částice vyžadují náročnější podmínky plnění, aby bylo dosaženo kvalitních kolon.

Literatura

- [1] Horváth, C. G.; Preiss, B. A.; Lipsky, S. R.: Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Analytical Chemistry* **39**, 1422–1428 (1967).
- [2] Keller, H. P.; Erni, F.; Linder, H. R.; Frei, R. W.: Dynamic Slurry-Packing Technique for Liquid Chromatography Columns. *Analytical Chemistry* **49**, 1958–1963 (1977).
- [3] Ehlert, S.; Rösler, T.; Talarek, U.: Packing density of slurry-packed capillaries at low aspect ratios. *Journal of Separation Science* **31**, 1719–1728 (2008).
- [4] Borra, C.; Han, S. M.; Novotny, M.: Quantitative analytical aspects of reversed-phase liquid chromatography with slurry-packed capillary columns. *Journal of Chromatography* **385**, 75–85 (1987).
- [5] Bristow, P. A.; Brittain, P. N.; Riley, C. M.; Williamson, B. F.: Upward slurry packing of liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography* **131**, 57–64 (1977).
- [6] Stout, R. W.; DeStefano, J. J.; Snyder, L. R.: High-performance liquid chromatographic column efficiency as a function of particle composition and geometry and capacity factor. *Journal of Chromatography* **282**, 263–286 (1983).
- [7] Gluckman, J. C.; Hirose, A.; McGuffin, V. L.; Novotny, M.: Performance evaluation of slurry-packed capillary columns for liquid chromatography. *Chromatographia* **17**, 303–309 (1983).
- [8] Meyer, R. F.; Hartwick, R. A.: Efficient Packing of Small Particle Microbore Columns. *Analytical Chemistry* **56**, 2211–2214 (1984).
- [9] Crescentini, G.; Bruner, F.; Mangani, F.; Yafeng, G.: Preparation and Evaluation of Dry-Packed Capillary Columns for High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **60**, 1659–1662 (1988).
- [10] Roulin, S.; Dmoch, R.; Carney, R.; Bartle, K. D.; Myers, P.; Euerby, M. R.; Johnson, C.: Comparison of different packing methods for capillary electrochromatography columns. *Journal of Chromatography A* **887**, 307–312 (2000).

- [11] Colón, L. A.; Maloney, T. D.; Fermier, A. M.: Packing columns for capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **887**, 43–53 (2000).
- [12] Sarker, M.; Guiochon, G.: Study of the operating conditions of axial compression columns for preparative chromatography. *Journal of Chromatography A* **709**, 227–239 (1995).
- [13] Sarker, M.; Guiochon, G.: Study of the packing behavior of radial compression columns for preparative chromatography. *Journal of Chromatography A* **683**, 293–309 (1994).
- [14] Kirkland, J. J.; DeStefano, J. J.: The art and science of forming packed analytical high-performance liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A* **1126**, 50–57 (2006).
- [15] Konishi, M.; Mori, Y.; Amano, T.: High-Performance Packed Glass-Lined Stainless Steel Capillary Column for Microcolumn Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **57**, 2235–2239 (1985).
- [16] Yang, F. W.: Fused-silica narrow-bore microparticle-packed-column high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **236**, 265–277 (1982).
- [17] Karlsson, K. E.; Novotny, M.: Separation Efficiency of Slurry-Packed Liquid Chromatography Microcolumns with Very Small Inner Diameters. *Analytical Chemistry* **60**, 1662–1665 (1988).
- [18] Capiello, A.; Palma, P.; Mangani, F.: New materials and packing techniques for micro-HPLC packed capillary columns. *Chromatographia* **32**, 389–391 (1991).
- [19] Vissers, J. P. C.; Claessens, H. A.; Laven, J.; Cramers, C. A.: Colloid Chemical Aspects of Slurry Packing Techniques in Microcolumn Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **67**, 2103–2109 (1995).
- [20] Shelly, D. C.; Gluckman, J. C.; Novotny, M. V.: Dead-Volume Free Termination for Packed Columns in Microcapillary Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **56**, 2990–2992 (1984).
- [21] Kennedy, R. T.; Jorgenson, J. W.: Preparation and Evaluation of Packed Capillary Liquid Chromatography Columns with Inner Diameters from 20 to 50 μm . *Analytical Chemistry* **61**, 1128–1135 (1989).

- [22] Hsieh, S.; Jorgensson, J. W.: Preparation and Evaluation of Slurry-Packed Liquid Chromatography Microcolumns with Inner Diameters from 12 to 33 μm . *Analytical Chemistry* **68**, 1212–1217 (1996).
- [23] MacNair, J. E.; Lewis, K. C.; Jorgensson, J. W.: Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns. *Analytical Chemistry* **69**, 983–989 (1997).
- [24] Zimina, T.; Smith, R. M.; Highfield, J. C.; Myers, P.; King, B. W.: Study of the flow development during the slurry packing of microcolumns for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **728**, 33–45 (1996).
- [25] Cortes, H. J.; Pfeiffer, C. D.: Microcolumn Size Exclusion Chromatography with Polymeric Stationary Phases. *Analytical Chemistry* **65**, 1476–1480 (1993).
- [26] Boughtflower, R. J.; Underwood, T.; Maddin, J.: The production of packed capillaries using a novel pressurised ultrasound device. *Chromatographia* **41**, 398–402 (1995).
- [27] Verzele, M.; Dewaele, C.; Duquet, D.: Observations and ideas on slurry packing of liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography* **391**, 111–118 (1987).
- [28] Wong, V.; Shalliker, R. A.; Guiochon, G.: Evaluation of the Uniformity of Analytical-Size Chromatography Columns Prepared by the Downward Packing of Particulate Slurries. *Analytical Chemistry* **76**, 2601–2608 (2004).
- [29] Shen, Y.; Yang, Y. J.; Lee, M. L.: Fundamental Considerations of Packed-Capillary GC, SFC, and LC Using Nonporous Silica Particles. *Analytical Chemistry* **69**, 628–635 (1997).
- [30] Andreolini, F.; Borra, C.; Novotny, M.: Preparation and Evaluation of Slurry-Packed Capillary Columns for Normal-Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **59**, 2428–2432 (1987).
- [31] Guiochon, G.; Farkas, T.; Guan-Sajonz, H.; Koh, J.; Sarker, M.; Stanley, B. J.; Yun, T.: Consolidation of particle beds and packing of chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* **762**, 83–88 (1997).
- [32] Farkas, T.; Guiochon, G.: Contribution of the Radial Distribution of the Flow Velocity to Band Broadening in HPLC Columns. *Analytical Chemistry* **69**, 4592–4600 (1997).

- [33] Shalliker, R. A.; Broyles, B. S.; Guiochon, G.: Physical evidence of two wall effects in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **888**, 1–12 (2000).
- [34] Tallarek, U.; Baumeister, E.; Albert, K.; Bayer, E.; Guiochon, G.: NMR imaging of the chromatographic process – Migration and separation of bands of gadolinium chelates. *Journal of Chromatography A* **696**, 1–18 (1995).
- [35] Bristow, P. A.; Knox, J. H.: Standardization of Test Conditions for High Performance Liquid Chromatography Columns. *Chromatographia* **10**, 279–289 (1977).
- [36] Walters, M. J.: Classification of Octadecyl-Bonded Liquid Chromatography Columns. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **70**, 465–469 (1987).